

Biopesticide comprenant une composition riche en polysulfures de diallyle

5

La présente invention est relative à des compositions à base de polysulfures de diallyle, et de biopesticides comprenant ces compositions. L'invention est aussi relative à l'utilisation de biopesticides à base de ces compositions riches en polysulfures de diallyle pour leur activité insecticide efficace vis-à-vis d'un grand nombre d'insectes.

10 L'invention est également relative au procédé d'obtention de ces compositions.

15 Les composés secondaires des plantes sont réputés depuis l'antiquité pour leurs propriétés pharmacologiques et l'homme s'intéresse depuis des décennies à leurs propriétés biologiques.

Parmi ces plantes, l'ail est l'une des plus étudiées et des plus utilisées pour ses diverses propriétés antibactériennes, antimycotiques, mais également pour son action positive sur la diminution du cholestérol, l'inhibition de l'agrégation plaquettaire ou l'amélioration de l'activité fibrinolytique (Monographie de l'ail, Commission E -1998).

20 Cette diversité d'activités est directement liée à la diversité des molécules soufrées (actifs) qui sont obtenues lors de la constitution et la dégradation de molécules précurseurs telles que le γ -glutamyl-cystéine et l'alline (molécules que l'on trouve dans l'ail). L'action antibactérienne observée est par exemple liée à l'allicine issue de la transformation enzymatique de l'alline (Cavallito et al 1944).

25 L'intérêt phytosanitaire des molécules soufrées et plus particulièrement celles de l'ail a également été étudiée (Auger 2001). Des cas d'effets antiappétents et répulsifs ont été observés par exemple sur *Epilachna varivestis* où des extraits d'ail réduisent significativement le taux de ponte des femelles de psylle du poirier *Cocopsylla pyricola* (Weissling et al. 1997).

30 De plus, divers ordres d'insectes sont sensibles aux effets insecticides des allium. C'est le cas de la mouche blanche des serres *Bemisia argentifolii*, dont les œufs, les nymphes et les adultes sont sensibles à la présence de divers extraits d'ail (Flint et al. 1995).

Auger et ses collaborateurs ont montré que les insectes soumis à une fumigation ne présentent pas tous la même sensibilité aux molécules soufrées. Ils ont calculé des concentrations létales CL50 (concentration exprimée en mg de produit/L air pour laquelle 50 % des insectes sont tués après 24 h de traitement) sur des molécules pures présentes dans l'ail : le disulfure de diallyle (DAS2), le disulfure de diméthyle (DMS2), le disulfure de dipropyle (DPS2), le thiosulfinate de diméthyle (TiM2), l'allicine (TiA2) (Auger et al 2002, 2001 ; Huignard et al 1999). Les CL50 varient en fonction des insectes testés mais aussi en fonction du stade de développement de l'insecte (un adulte est généralement plus sensible qu'une larve, elle même plus sensible que l'œuf).

Le brevet EP 0 843 965 décrit une émulsion pesticide contenant un émulsifiant éventuellement associé à des extraits d'ail. Cependant, il est seulement noté que l'extrait d'ail est obtenu par une extraction à l'aide d'un solvant organique à partir de gousses fraîches et la composition des extraits utilisés n'est pas décrite.

Le brevet EP 0 945 066 décrit une composition à vocation pesticide, insecticide et/ou fongicide comprenant un extrait ou une huile d'ail en mélange avec un autre actif (huile essentielle, huile végétale, minérale ou animale...). Aucune composition précise des extraits d'ail utilisés n'est cependant décrite.

Malgré l'intérêt phytosanitaire de l'ail, tous les produits commerciaux à base d'ail connus (par ex., Garlic Barrier, Organomex Gard-S) sont préconisés en tant qu'agent répulsif ou comme stimulateur de croissance. Aucun produit n'est à ce jour commercialisé comme insecticide. La complexité de la chimie de l'ail, liée aux difficultés analytiques et industrielles pour obtenir des extraits d'ail standardisés ayant une composition parfaitement définie et reproductible, explique qu'aucun produit commercial de composition clairement établie ne soit disponible en tant que biopesticide sur le marché actuellement.

La demanderesse a découvert une composition chimique spécifique et bien définie ayant une activité insecticide efficace vis-à-vis d'un grand nombre d'insectes et répondant aux conditions habituelles d'utilisation en milieu agricole (stabilité satisfaisante au stockage à température ambiante).

La demanderesse a ainsi mis au point des biopesticides comprenant une composition caractérisée par une teneur définie en polysulfures de diallyle, qui constitue l'objet de l'invention.

5

Un autre objet de l'invention est constitué par l'utilisation de ces biopesticides pour lutter contre des ravageurs des denrées agricoles et alimentaires ainsi que les ravageurs des bois et textiles.

10 Un autre objet de l'invention est constitué par l'utilisation de ces biopesticides pour lutter contre l'infestation des humains et animaux par les insectes suceurs.

Un autre objet de l'invention est constitué par le procédé de préparation d'une composition comportant ces caractéristiques.

15 Un autre objet de l'invention est constitué par des compositions caractérisées par une teneur définie en polysulfures de diallyle et la présence de γ -glutamyl-S-allylcystéine.

D'autres objets apparaîtront à la lecture de la description et des exemples qui suivent.

20 La présente invention a pour objet des biopesticides comprenant entre autres une composition caractérisée par le fait qu'elle contient du sulfure de diallyle (DAS), du disulfure de diallyle (DAS2), du trisulfure de diallyle (DAS3), du tétrasulfure de diallyle (DAS4) dont la somme en poids équivaut au moins à un milligramme par gramme de composition.

25 Par DAS, on entend sulfure de diallyle, par DAS2, on entend disulfure de diallyle, par DAS3, on entend trisulfure de diallyle, par DAS4, on entend tétrasulfure de diallyle.

De préférence, au moins 50 % des DASn sont constitués de DAS2 et DAS3. Par DASn, on entend des polysulfures de diallyle.

30 Les biopesticides comprenant la composition selon l'invention peuvent comprendre un extrait d'ail. La composition comprise dans les biopesticides selon l'invention peut comprendre également du Gluacs (γ -glutamyl-S-allylcystéine), de l'allicine ou de l'alliine

La composition selon l'invention peut être dépourvue d'allicine et/ou d'alliine.

5 De préférence, dans cet extrait d'ail, les composés soufrés sont majoritaires. Par composés soufrés, on entend polysulfures de diallyle (DASn), polysulfures d'allyle méthyle (AMSn), polysulfures de diméthyle (DMSn) dont le disulfure de diméthyle (DMS2), polysulfures d'allyle propyle (APSn), polysulfures de méthyle propyle (MPSn), polysulfures de dipropyle (DPSn) dont le disulfure de dipropyle (DPS2), , thiosulfinate de diméthyle (TiM2) et alicine (TiA2).

10 De préférence, les DASn représentent plus de 50 % des composés soufrés de l'extrait d'ail.

15 La présente invention a également pour objet une composition caractérisée par le fait qu'elle contient du sulfure de diallyle (DAS), du disulfure de diallyle (DAS2), du trisulfure de diallyle (DAS3), du tétrasulfure de diallyle (DAS4) dont la somme en poids équivaut au moins à un milligramme par gramme de composition et du Gluacs.

20 15 Cette composition peut comprendre également de l'allicine ou de l'alliine.

25 La composition selon l'invention peut être dépourvue d'allicine et/ou d'alliine.

30 Le biopesticide selon l'invention peut également comprendre des adjuvants de formulation tels que des huiles, émulsifiants et solvants divers pouvant par exemple faciliter l'application et améliorer l'efficacité du biopesticide par une meilleures fixation sur les feuilles.

Des exemples d'adjuvants sont les huiles végétales, propylène glycol, les épaississants comme par exemple la maltodextrine.

25 Des exemples d'émulsifiants comprennent la lécithine ou les sucro-esters. Des exemples de solvant sont les alcools et notamment l'éthanol, les cétones et notamment la méthyl éthyl cétone, les éthers dont le diéthyléther.

30 L'invention a également pour objet l'utilisation du biopesticide pour lutter contre les ravageurs des denrées agricoles et alimentaires, et les ravageurs des bois et textiles. Ce biopesticide peut également être utilisé pour lutter contre l'infestation des humains et animaux par les poux ou autres insectes suceurs.

Les compositions riches en DASn décrites dans l'invention sont susceptibles d'être obtenues par le procédé de préparation suivant qui permet la préparation sélective

d'une composition renfermant du DAS, du DAS2, du DAS3, du DAS4 dont la somme en poids équivaut au moins à un milligramme par gramme de composition à partir d'ail.

Les extraits d'ail utilisés dans la composition selon l'invention sont obtenus par une extraction aqueuse à partir d'aux frais.

5

Le procédé de préparation d'une telle composition consiste à

- broyer à chaud les aux frais,
- récupérer les fractions volatiles,
- presser le broyat en présence ou non d'eau à une température comprise entre 10 et 10 60 °C,
- filtrer le jus de l'ail,
- le concentrer sous vide à basse température ($T \leq 60^{\circ}\text{C}$) jusqu'à obtenir une concentration adéquate, généralement comprise entre 30 et 75 degrés Brix. Le degré Brix dont la mesure est effectuée à l'aide d'un réfractomètre, est le poids en gramme de matières sèches contenu dans 100 grammes de produit..
- récupérer les fractions volatiles et les réintroduire dans les extraits pour obtenir la composition qui fait l'objet de la présente invention.

Dans certains cas, l'activité enzymatique de l'ail (notamment celle liée à l'alliinase) est inhibée par un traitement thermique adéquat appliqué avant l'extraction.

20 Une acidification permet aussi d'inhiber l'activité enzymatique. Il est également possible d'utiliser des sulfites pour éviter les phénomènes d'oxydation lors du broyage au cours du déroulement du procédé.

25 Les différentes conditions d'extraction sont maîtrisées afin d'obtenir des compositions à base d'extraits d'ail présentant des profils en composés soufrés et des compositions chimiques différentes, notamment en γ -glutamyl-S-allylcystéine (Gluacs), en allicine (TiA2) et en polysulfures de diallyle (DASn).

30 Des variantes dans le procédé précédemment décrit de préparation de la composition selon l'invention ont conduit à des compositions numérotées « extrait 00 » à « extrait 05 ».

Les exemples suivants illustrent l'invention sans la limiter aucunement.

Exemple 1 : Compositions selon l'invention et molécules utilisées en comparaison

Les produits commerciaux connus à base d'ail ne revendiquent pas de propriétés pesticides à proprement parler. Ils sont vendus en tant qu'agent répulsif ou stimulateurs de croissance. Parmi ceux-ci, la demanderesse a retenu l'Organomex Gard-S, le Garlic Barrier et le Garvitan. Deux molécules de référence, le DAS2 (Aldrich) et l'allicine (TiA2 purifié par Mr Auger, Université de Tours) sont également utilisées en comparaison.

10

La composition des extraits est déterminée par HPLC sur une colonne SpherisorbODS2 (5 μ m 4,6 x 250 mm) équipée d'une pré-colonne de 10 mm remplie de la même phase stationnaire. Le gradient d'élution est déterminé d'après les travaux de Knoblock et Lawson (Knoblock et col. (1990) Planta .med. 56, 202-211, Lawson et al (1991) Planta Med. 57, 363-370).

Un chromatogramme typique est présenté sur la figure jointe (figure 1) et la composition des différents extraits est synthétisée dans le tableau suivant, la composition des différentes molécules étant exprimée en mg/g d'extrait.

| Extrait | Gluacs | Alliine | Allicine | DAS | DAS2 | DAS3 | DAS4 | DASn |
|------------------|--------|---------|----------|-------|-------|--------|-------|--------|
| Extrait 00 | 1.250 | 7.550 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Extrait 01 | 6.854 | 0 | 0.000 | 0.741 | 1.898 | 6.033 | 1.375 | 10.047 |
| Extrait 02 | 7.027 | 0 | 0.000 | 0.957 | 3.964 | 10.178 | 1.473 | 16.572 |
| Extrait 03 | 5.870 | 0 | 0.000 | 0.024 | 0.134 | 0.781 | 0.226 | 1.165 |
| Extrait 04 | 0.000 | 0 | 0.000 | 0.902 | 3.737 | 9.595 | 1.389 | 15.622 |
| Extrait 05 | 0.000 | 0 | 0.391 | 0.009 | 0.023 | 0.073 | 0.000 | 0.105 |
| Garlic Barrier | 0.000 | 0 | 0.000 | 0.003 | 0.007 | 0.010 | 0.002 | 0.022 |
| Organomex Gard-S | 4.501 | 0 | 0.000 | 0.011 | 0.025 | 0.202 | 0.055 | 0.293 |
| Garvitan | 0.000 | 0 | 0.146 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

20

DASn = somme des concentrations en [DAS+DAS2+DAS3+DAS4]

Les produits du commerce sont, en fonction de la molécule soufrée considérée, entre 2 et 1000 fois moins riches en composés soufrés que les extraits 01 à 04 faisant l'objet de la présente demande.

5

Exemple 2 : Activité pesticide en espace clos des extraits 01 à 04

L'activité pesticide des extraits est mesurée en espace clos sur des insectes adultes. Chaque valeur représente la moyenne de trois expériences faisant intervenir chacune 30 insectes représentatifs de trois ordres d'insectes différents :

10

- lépidoptère (La mite du vêtement *Tineola bisselliella*),
- isoptère (le terme de Saintonge *Reticulitermes santonensis*) et
- coléoptère (la bruche du haricot *Callosobruchus maculatus*):

15

La CL50 mesurée correspond à la concentration exprimée en mg de produit / litre d'air pour laquelle 50% des insectes sont tués après 24 h de traitement.

Les résultats, représentés sur l'histogramme joint (figure 2), sont synthétisés dans le tableau suivant :

| Extrait | Mite CL50 (mg / l) | Termite CL50 (mg / l) | Bruche CL50 (mg / l) |
|------------------|-----------------------|--------------------------|-------------------------|
| Extrait 01 | 1.62 | 1.3 | 24.96 |
| Extrait 02 | 1.36 | 1.83 | 24.82 |
| Extrait 03 | 2.43 | 1.8 | 25.96 |
| Extrait 04 | 1.52 | 2.12 | 17.82 |
| Extrait 05 | 13.20 | 12.34 | NM |
| Garlic Barrier | 67.4 | 370.12 | 242.82 |
| Organomex Gard-S | 50.65 | 92.04 | NQ |
| Garvitan | 23.32 | 24.29 | NQ |
| DAS2 | 0.02 | NM | 0.5 |
| TiA2 | NM | NM | 0.16 |

NM = Non Mesuré

20

NQ = Non Quantifiable du fait de l'absence d'activité

Ainsi, les extraits d'ail 01 à 04 et les molécules de référence (DAS2 et TiA2) testés montrent une activité insecticide, les molécules de référence présentant les efficacités les plus importantes.

5 Les extraits d'ail selon l'invention sont très efficaces sur les trois sortes d'insectes testés avec des CL50 comprises entre 1.4 et 2.4 mg/L pour la mite, entre 1.3 et 2.1 mg/L pour le terme, et entre 18.0 et 25.0 mg/L pour la bruche. Ces espèces d'insectes sont représentatives d'insectes nuisibles d'intérêt économique, le terme étant préjudiciable au bois d'œuvre, la bruche étant un ravageur des denrées stockées et la mite étant préjudiciable aux vêtements et aux textiles.

10 Les composés du commerce testés, Garlic Barrier, Organomex Gard-S et Garvitan, montrent tous des activités très nettement inférieures aux extraits faisant l'objet de la présente demande. Le Garlic Barrier, le seul efficace sur les 3 insectes testés, montre une efficacité entre 10 et 285 fois plus faible que les extraits 01 à 04.

15 Les composés Organomex Gard S et Garvitan ne sont pas efficaces sur la bruche, ce qui peut être expliqué par une plus grande résistance de ce coléoptère aux traitements phytosanitaires en général.

Exemple 3 : Relations entre efficacité pesticide et composition chimique

20 Les extraits riches en DASn ont montré une activité pesticide élevée, beaucoup plus que l'extrait contenant de l'allicine. Or, de nombreux articles montrent que l'allicine est le composé le plus toxique pour la plupart des insectes, et que la toxicité des molécules de la plus toxique vers la moins toxique est : TiA2 (allicine) \geq TiM2 (thiosulfinate de diméthyle) $>$ DMS2 (disulfure de diméthyle) $>$ DAS2 $>$ DPS2 (disulfure de dipropyle) (Auger et Thibout, 2001 ; Auger et al., 2002 ; Auger et al., 1999). Il est généralement reconnu que les Ti (thiosulfinates) sont 10 à 100 fois plus toxiques que les DS (disulfures).

25 Bien qu'il n'y ait que très peu de travaux décrivant l'effet pesticide des DASn, l'efficacité des extraits faisant l'objet de la demande peut être associée à leur richesse en DAS3, le DAS3 étant connu pour être plus toxique que le DAS2 (Nammour et al., 1989).

Il est également possible, dans une certaine mesure, de corrélérer l'activité biopesticide des extraits selon l'invention à la teneur en DASn. Ainsi en partant de

l'activité du DAS2 de référence sur mite et bruche, on peut calculer l'activité biopesticide théorique que l'on obtiendrait en assimilant la concentration totale en DASn des extraits à du DAS2. Ce test n'a pas été réalisé sur termite.

Les activités du DAS2 sont de 0,02mg par litre et de 0,5 mg par litre pour obtenir la CL50 respectivement sur la mite et la bruche (voir tableau de l'exemple 2). L'extrait 01 par exemple contient 10,047 mg de DASn par gramme d'extrait (déterminé dans l'exemple 1). Si on assimile cette quantité de DASn à du DAS2, alors il faudrait 1,99mg d'extrait pour obtenir une CL50 identique à celle obtenue avec le DAS2 de référence. Or, les valeurs observées montrent que 1,62mg d'extrait 01 par litre est suffisant pour atteindre la CL50.

Les autres valeurs du tableau sont calculées sur le même principe.

| Extrait | Mite CL50 (mg/l) calculée | Mite CL50 (mg/l) observée | Bruche CL50 (mg/l) calculée | Bruche CL50 (mg/l) observée |
|---------------------|---------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Extrait 01 | 1.99 | 1.62 | 49.77 | 24.96 |
| Extrait 02 | 1.21 | 1.36 | 30.17 | 24.82 |
| Extrait 03 | 17.17 | 2.43 | 429.18 | 25.96 |
| Extrait 04 | 1.28 | 1.52 | 32.01 | 17.82 |
| Garlic Barrier | 909 | 67.4 | 22757 | 242.82 |
| Organomex Gard-S | 68 | 50.65 | 1706.5 | NQ |
| DAS2 | 0.02 | 0.02 | 0.5 | 0.5 |

En règle générale, on constate que l'activité observée (inverse de la CL50) est légèrement plus forte que l'activité calculée, ce qui confirme l'efficacité supérieure des DAS3, voire DAS4, par rapport à celle du DAS2. Ceci est d'autant plus vrai que la teneur totale en DASn est faible comme dans le cas de l'extrait 03 par exemple. Une teneur élevée en DAS3 est donc avantageuse au niveau de l'efficacité biopesticide de l'extrait selon l'invention.

Les produits du marché Garlic Barrier et Organomex Gard S renferment trop peu de DASn pour montrer une efficacité satisfaisante, et on constate même un effet seuil puisque l'Organomex n'agit pas sur la bruche quelque soit son dosage.

5 Le Garvitan ou l'extrait O5, relativement riches en alicine, présentent une activité faible. Le principal inconvénient de ce produit est la faible stabilité de l'alicine à température ambiante (conditions de stockage communément utilisées en agriculture). Le fournisseur du Garvitan préconise une conservation de cet extrait à + 4 °C avec une DLUO (date limite d'utilisation optimale) de 6 mois.

10 En conclusion, les produits disponibles sur le marché ne sont pas vendus en tant que pesticides. Ils sont pauvres en alicine et en DASn, et en tout cas, trop pauvres pour montrer une activité satisfaisante.

Exemple 4 : Activité pesticide sur aleurodes par pulvérisation

15 L'activité répulsive et létale de l'extrait 01 vis-à-vis des mouches blanches *Trialeurodes vaporarium* (adultes fournies par la société Biobest) est mesurée sur des plants de tomate de 15 cm de haut dans une tour de Potter en conditions contrôlées (température 21 °C, humidité relative 70 %).

20 Les larves utilisées sont obtenues en installant des adultes sur des pieds de tomate non traités.

Les modalités testées sont les suivantes :

| Modalité | Produit actif (L/ha) |
|---|-------------------------|
| Contrôle (eau distillée) | 0 |
| Extrait d'ail 01 | 2 |
| Extrait d'ail 01 | 3 |
| Extrait d'ail 01 | 4 |
| Référence toxique : Applaud (produit commercial) | 0.3 |

25 Chaque modalité comporte 4 répétitions comprenant 10 à 25 adultes.

5 Les différents produits actifs sont dilués au demi dans un diluant adéquat. L'applaud, pesticide de synthèse commercialisé par la société Calliope et utilisé ici comme référence n'est pas dilué car déjà prêt à l'emploi. Les tests de répulsions sont menés par pulvérisation sur les feuilles avant introduction des adultes, les tests de mortalités sont menés après une seule pulvérisation sur les feuilles infestées par les aleurodes.

Les études ont été effectuées à l'aide d'un logiciel statistique – ITCF (Institut, Technique des Céréales et Fourrages de Paris).

10 Les résultats de l'analyse statistique mettent en évidence le fait que l'extrait 01 a un effet répulsif sur les femelles à partir de la dose de 3 L/ha occasionnant une réduction significative de la fécondité des femelles une semaine après leur installation :

| Modalité | Nombre de femelles (somme des différentes répétitions) | Fécondité (nombre moyen d'œufs pondus / femelles) | Groupes homogènes (test de Newman-Keuls au seuil de 5%) |
|---------------------|---|--|--|
| Témoin | 100 | 22 | A |
| Extrait 01 à 2 L/ha | 67 | 15 | AB |
| Extrait 01 à 3 L/ha | 190 | 11 | BC |
| Extrait 01 à 4 L/ha | 115 | 6 | BC |
| Applaud à 0.3 L/ha | 42 | 14 | C |

15

L'extrait 01, dès la dose de 2 L/ha, a aussi un effet significatif sur la mortalité des jeunes larves. A la dose de 4 L/ha, l'efficacité est identique à celle de l'Applaud à 0.3 L/ha :

20

| Modalité | Mortalité mesurée (% de larves mortes / larves totales) | Mortalité transformée | Groupes homogènes (test de Newman- Keuls au seuil de 5 %) |
|----------|---|--------------------------|--|
| | | | |

| | | | |
|---------------------|------|------|----|
| Témoin | 0 | 0 | A |
| Extrait 01 à 2 L/ha | 26.6 | 27.0 | B |
| Extrait 01 à 3 L/ha | 55.6 | 48.2 | BC |
| Extrait 01 à 4 L/ha | 80.0 | 67.2 | C |
| Applaud à 0.3 L/ha | 78.4 | 67.7 | C |

L'extrait 01 a un effet encore plus important sur les larves les plus âgées (larves au stade L3-L4). Dès la plus faible dose (2 L/ha), les résultats obtenus mettent en évidence une efficacité comparable, voire supérieure à celle de la référence :

5

| Modalité | Mortalité mesurée (% de larves mortes / larves totales) | Mortalité transformée | Groupes homogènes (test de Newman- Keuls au seuil de 5 %) |
|---------------------|---|--------------------------|--|
| Témoin | 0 | 0 | A |
| Extrait 01 à 2 L/ha | 92.8 | 73.8 | B |
| Extrait 01 à 3 L/ha | 100 | 90.0 | C |
| Extrait 01 à 4 L/ha | 98.6 | 85.4 | C |
| Applaud à 0.3 L/ha | 93.6 | 75.7 | B |

L'analyse de la mortalité des jeunes larves (analyse sur 355 larves) à l'aide d'un logiciel d'analyse probit permet de déterminer une DL50 (dose occasionnant 50 % de mortalité) pour l'extrait 01 de 2.64 L/ha, avec une fourchette comprise entre 2.34 et 10 2.87 L/ha.

L'extrait 01 est donc très actif sur les larves d'aleurode pour lesquelles un effet dose a pu être mis en évidence. Cet extrait est d'ailleurs plus efficace sur les larves âgées que sur les jeunes, avec une efficacité comparable à celle de l'Applaud dès 2 L/ha sur les larves âgées et dès 4 L/ha sur les larves jeunes.

15

Exemple 5 : Activité pesticide sur pucerons

La même étude que précédemment est conduite aux mêmes dosages sur les pucerons des céréales *Rhopalosiphum padi* sur des plants de blé de 15 cm de haut (15 à 20 50 pucerons par modalité et par essai).

Le produit commercial de référence est le Decis CE, pesticide de synthèse dosé à 0.12 kg / ha.

| Modalité | Mortalité mesurée (% de pucerons morts) | Mortalité transformée | Groupes homogènes (test de Newman-Keuls au seuil de 5 %) |
|----------------------|--|-----------------------|---|
| Témoin | 2.44 | 7.25 | A |
| Extrait 01 à 2 L/ha | 4.34 | 8.06 | A |
| Extrait 01 à 3 L/ha | 4.34 | 11.51 | A |
| Extrait 01 à 4 L/ha | 12.14 | 20.96 | B |
| Decis à 0.12 kg / ha | 92.18 | 74.06 | C |

5 L'extrait 01 se montre actif contre les pucerons mais à des dosages beaucoup plus élevés que le produit de référence.

Exemple 6 : Activité pesticide sur araignée rouge

10 La même étude que celle décrite dans l'exemple 4 est menée aux mêmes dosages sur l'araignée rouge *Panonychus ulmi* mise en test sur des feuilles de pommiers maintenues en survie sur du papier filtre avec une bande de coton sur le pétiole. L'aire d'exposition aux produits de traitement est délimitée sur les feuilles à l'aide d'une barrière de glue.

15 Le produit de traitement de référence est le Kelthane, pesticide de synthèse, au dosage de 1 L/ha.

Test sur des adultes :

| Modalité | Mortalité sur acariens adultes (% de pucerons morts) | Groupes homogènes (test de Newman-Keuls au seuil de 5%) |
|---------------------|---|---|
| Témoin | 38 | A |
| Extrait 01 à 2 L/ha | 100 | B |
| Extrait 01 à 3 L/ha | 100 | B |
| Extrait 01 à 4 L/ha | 100 | B |
| Kelthane à 1 L/ha | 100 | B |

N.B. il n'est pas tenu compte des acariens englués dans la mortalité.

L'extrait d'ail a un effet très positif sur la mortalité des acariens adultes, et cela dès le plus faible dosage :

5

Test sur des larves :

| Modalité | Mortalité de larves jeunes (% de pucerons morts) | Mortalité transformée | Groupes homogènes (test de Newman-Keuls au seuil de 5 %) |
|---------------------|---|-----------------------|---|
| Témoin | 0 | 34.97 | A |
| Extrait 01 à 2 L/ha | 100 | 90 | B |
| Extrait 01 à 3 L/ha | 100 | 90 | B |
| Extrait 01 à 4 L/ha | 100 | 90 | B |
| Kelthane à 1 L/ha | 100 | 90 | B |

L'extrait 01 a aussi un effet très important sur la mortalité de larves jeunes dès le plus faible dosage :

Ainsi, l'extrait 01 selon l'invention présente un effet très significatif sur la mortalité, aussi bien sur les adultes que sur les larves de l'araignée rouge.

Il est ainsi montré dans ces différents tests (exemple 4, 5 et 6) que l'extrait d'ail aux doses testées est aussi efficace que les produits de synthèse qui sont les références du marché.

15

Exemple 7 : activité pédiculicide sur les insectes suceurs

L'activité anti-poux de l'extrait d'ail 02 est mesurée *in vitro*. Les poux utilisés sont les poux *Pediculus humanus humanus* élevés en laboratoire et gorgés de sang (élevage maintenu sur des lapins).

Les poux sont immergés par lots de 5 individus dans 300 μ L d'eau distillée (témoin) ou dans 300 μ L de l'extrait d'ail dilué à 50 % P/P avec de l'eau (pour éviter d'avoir une texture collante) dans des tubes Eppendorf. Après une agitation manuelle de 5 secondes, le contenu de chaque tube est versé sur une rondelle de papier filtre de 5 cm de diamètre tapissant le fond d'une boîte de Pétri. La boîte est fermée et conservée à

température ambiante. Il est noté, pour chaque boîte, le nombre de poux vivants ou morts en fonction du temps.

Les poux sont fractionnés en lots et chaque expérience est menée sur 5 poux. L'expérience est répétée 10 fois pour réaliser la mesure sur un total de 50 poux pour chaque condition. Les résultats sont les suivants :

| Heures | Pourcentage de poux morts en fonction du temps | |
|--------|--|----------------------------------|
| | Témoin | Extrait 02 dilué à 50 % en poids |
| 0 | 0 | 0 |
| 1 | 0 | 12.0 |
| 2 | 0 | 12.0 |
| 3 | 0 | 12.0 |
| 4 | 0 | 16.0 |
| 5 | 0 | 18.0 |
| 6 | 0 | 18.0 |
| 7 | 0 | 18.0 |
| 8 | 0 | 20.0 |
| 9 | 0 | 24.0 |
| 10 | 3.0 | 38.0 |
| 24 | 7.0 | 74.0 |

L'extrait 02 montre une activité pédiculicide réelle, même si le temps de contact nécessaire entre poux et extrait est assez long.

Exemple 8 : Formulation d'un biopesticide selon l'invention pour lutter contre les coléoptères

15 Les pourcentages des différents composés sont en poids :

- 50 % d'extrait d'ail contenant 0.7 mg de DAS / g d'extrait ; 1.8 mg de DAS2 / g d'extrait ; 5 mg de DAS3 / g d'extrait et 1,3 mg de DAS4 / g d'extrait.
- 45 % d'huile de tournesol
- 5 % de lécithine de tournesol

Cette formulation de biopesticide destinée à lutter contre les coléoptères est utilisée sous serre ou en plein champ à raison de 20 kilogrammes de composition pulvérisée par hectare après dilution dans de l'eau.

REVENDICATIONS

1. Utilisation comme biopesticide d'une composition comprenant du sulfure de diallyle (DAS), du disulfure de diallyle (DAS2), du trisulfure de diallyle (DAS3), du tétrasulfure de diallyle (DAS4) dont la somme en poids est au moins de un milligramme par gramme de composition.
5
2. Utilisation selon la revendication 1 pour lutter contre les ravageurs des denrées agricoles et alimentaires, et les ravageurs des bois et textiles.
3. Utilisation selon la revendication 1 pour lutter contre l'infestation des humains et animaux par les poux ou autres insectes suceurs.
- 10 4. Biopesticide comprenant une composition caractérisée par le fait qu'elle renferme du sulfure de diallyle (DAS), du disulfure de diallyle (DAS2), du trisulfure de diallyle (DAS3), du tétrasulfure de diallyle (DAS4) dont la somme en poids est au moins de un milligramme par gramme de composition et des adjuvants de formulation.
- 15 5. Biopesticide selon la revendication 4, caractérisée par le fait qu'au moins 50 % des polysulfures de diallyle (DASn) sont constitués de DAS2 et DAS3.
6. Biopesticide selon l'une des revendications 4 ou 5, caractérisée par le fait qu'elle comprend un extrait d'ail.
- 20 7. Procédé de préparation d'une composition renfermant du DAS, du DAS2, du DAS3, du DAS4 dont la somme en poids est au moins de un milligramme par gramme de composition comprenant les étapes de broyage à chaud de l'ail et la récupération subséquent des fractions volatiles, puis une étape de pressage de l'ail suivie d'une étape de filtration de l'ail pressée puis une étape de concentration sous vide et la récupération subséquente des fractions volatiles.
25
8. Procédé selon la revendication 7, comprenant une étape d'inhibition de l'activité enzymatique de l'ail par un traitement thermique adéquat appliqué avant l'extraction.
9. Procédé selon la revendication 7, comprenant une étape d'inhibition de l'activité enzymatique de l'ail par une acidification adéquate.
30
10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 7 à 9, comprenant une étape d'utilisation de sulfites pour éviter les phénomènes d'oxydation.

11. Composition renfermant du DAS, du DAS2, du DAS3, du DAS4 dont la somme en poids est au moins de un milligramme par gramme de composition et du gamma-glutamyl-S-allylcystéine (Gluacs) caractérisée par le fait qu'elle est susceptible d'être obtenue par le procédé tel que défini dans l'une quelconque des revendications 7 à 10.

5 12. Composition caractérisée par le fait qu'elle renferme du sulfure de diallyle (DAS), du disulfure de diallyle (DAS2), du trisulfure de diallyle (DAS3), du tétrasulfure de diallyle (DAS4) dont la somme en poids est au moins de un milligramme par gramme de composition et qu'elle contient du Gluacs.

10 13. Composition selon la revendication 12, caractérisée par le fait qu'au moins 50 % des polysulfures de diallyle (DASn) sont constitués de DAS2 et DAS3.

14. Composition selon l'une des revendications 12 ou 13, caractérisée par le fait qu'elle comprend un extrait d'ail.

15 15. Composition selon la revendication 14, caractérisée par le fait que les composés soufrés constitués de polysulfures de diallyle (DASn), polysulfures d'allyle méthyle (AMSn), polysulfures de diméthyle (DMSn), polysulfures d'allyle propyle (APSn), polysulfures de méthyle propyle (MPSn), polysulfures de dipropyle (DPSn), thiosulfinate de diméthyle (TiM2), allicine (TiA2) sont majoritaires dans l'extrait d'ail.

20 16. Composition selon la revendication 14, caractérisée par le fait que les composés soufrés constitués de polysulfures de diallyle (DASn), disulfure de diméthyle (DMS2), disulfure de dipropyle (DPS2), thiosulfinate de diméthyle (TiM2), allicine (TiA2) sont majoritaires dans l'extrait d'ail.

25 17. Composition selon la revendication 14, caractérisée par le fait que les DASn représentent plus de 50 % des composés soufrés de l'extrait d'ail.

18. Composition selon la revendication 14, caractérisée par le fait qu'elle contient de l'allicine.

30 19. Composition selon la revendication 14, caractérisée par le fait qu'elle contient de l'alliine.